

На правах рукописи

КОВАЛЬ Анастасия Павловна

**Гены 4,5SН РНК: структура, эволюция,
транскрипция.**

специальность 03.00.03 — молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва
2008

Работа выполнена в Лаборатории эволюции геномов эукариот
Учреждения Российской академии наук Института молекулярной
биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Доктор биологических наук, профессор Д.А. Крамеров

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Кандидат биологических наук,

А.А. Буздин

Доктор биологических наук, профессор

В.С. Прасолов

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, кафедра молекулярной биологии.

Защита диссертации состоится « 22 » декабря 2008 г. в 11 ч на
заседании Диссертационного совета Д 002.37.01 при Учреждении
Российской академии наук Института биологии гена РАН по адресу:
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения
Российской академии наук Института молекулярной биологии РАН по
адресу по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д.32.

Автореферат разослан « 14 » ноября 2008 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

кандидат фарм. наук

Грабовская

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000439015

Л.С. Грабовская

Актуальность проблемы

За последние два десятилетия описано большое количество малых РНК длиной от 70 до 600 нуклеотидов, выполняющих в клетке самые разнообразные функции. Исследования строения и функций таких РНК и их генов открывают большой пласт процессов жизнедеятельности клетки, основная роль в которых не принадлежит белкам. Малые РНК участвуют в процессинге и модификации рибосомных РНК (U3 RNA, C/D box and H/ACA box RNAs), в сплайсинге мРНК (U1, U2, U4, U5, U6 RNAs), в котрансляционном транспорте белков через мембраны эндоплазматического ретикулума (7SL RNA), в регуляции клеточного цикла (7SK RNA). Ряд малых РНК принимает участие в регуляции генной активности (small interference RNAs).

Большая роль, которую малые РНК играют в клетке, делает особенно актуальным поиск некодирующих РНК и определение их возможных функций. Одним из важнейших аспектов в изучении низкомолекулярных РНК является анализ структуры и эволюции их генов. Данная работа посвящена исследованию организации, эволюции и особенностям транскрипции генов одной из малых РНК грызунов – 4,5S РНК.

Большинство малых РНК высоко консервативны и широко распространены среди млекопитающих. Однако несколько видов низкомолекулярных РНК, выделенных из грызунов, отсутствуют у млекопитающих других отрядов. Наиболее изучена BC1 РНК, выделенная из клеток представителей таких различных семейств грызунов, как мышиные (мыши, крысы), с одной стороны, и свинковые (морские свинки), с другой. При этом она отсутствует у человека, быка, кролика. BC1 встречается только в клетках нервной ткани, как и ее аналог, РНК BC200, выделенная из клеток человека и других приматов. BC1 и BC200 обладают небольшой гомологией в 3'-концевых районах. В дендритах обе эти РНК локализуются в областях, где происходит трансляция мРНК, и, возможно, участвуют в регуляции этого процесса. Показано, что BC1 способна взаимодействовать своей А-богатой 3'-концевой половиной с поли(А)-связывающим белком и фактором инициации трансляции eIF4A. Именно этим, видимо, объясняется способность BC1 ингибировать трансляцию (Wang et al, 2005).

Другие РНК, обнаруженные в клетках крыс и мышей, но отсутствующие у человека и кролика, были описаны еще в 1970-х годах и названы 4,5S₁ РНК и 4,5S РНК (последнюю позднее Harada et al, 1986, обозначили как 4,5S РНК_n, далее в наших работах – 4,5S_{SH} РНК). 4,5S₁ РНК встречается у грызунов только четырех родственных семейств (мышиные, хомячьи, слепышовые и бамбуковые крысы) и демонстрирует значительную консервативность нуклеотидной последовательности, что свидетельствует о ее вероятной функциональности (Gogolevskaya and Kramerov, 2002). 4,5S₁ РНК и 4,5S_{SH} РНК широко

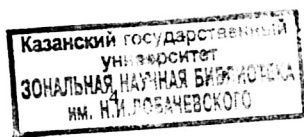
распространены в различных видах клеток и тканей. 4,5SH РНК обнаруживают ассоциированной с поли(А)-содержащими РНК, но ее функция остается неясной.

Все рассмотренные РНК объединяют следующие свойства: они синтезируются РНК-полимеразой III, имеют узкий круг распространения и обладают явным родством с тем или иным коротким ретропозоном (или коротким диспергированным элементом - SINE, Short Interspersed Element). 5'-концевые участки BC1 и BC200 РНК гомологичны ID- и Alu- элементам соответственно. 4,5S₁ РНК обладает некоторым сходством с элементом B2. Наконец, 4,5SH РНК на большей части своей длины высокоомологична элементу B1. Специально для обозначения РНК с узким кругом распространения был введен термин стеноРНК (Gogolevskaya and Kramerov, 2002). Группу стеноРНК составляют все рассмотренные малые РНК и ряд других. Узкое распространение свидетельствует о недавнем возникновении этих РНК в эволюции. Поэтому они могут быть очень удобными и ценными объектами для изучения процессов (механизмов) образования новых функциональных РНК и их генов.

4,5S₁ РНК закодирована в нескольких десятках генов, рассеянных по геному (Takeuchi and Harada, 1986). В отличие от этого, гены 4,5SH РНК в геномах мыши и крысы входят в состав длинных (4.2 и 5.3 т.п.н. соответственно), tandemно повторяющихся последовательностей (700 – 850 копий) (Schoeniger and Jelinek, 1986). Нуклеотидная последовательность такого повтора из генома мыши была секвенирована; это позволило показать, что каждый повтор содержит лишь один ген 4,5SH РНК (Schoeniger and Jelinek, 1986). Таким образом, 4,5SH представляет интерес как пример эволюционно молодой РНК, а также с точки зрения необычной организации ее генов в геноме.

В нашей лаборатории И.К. Гоголевской был исследован круг распространения 4,5SH РНК. Используя Нозерн-гибридизацию и ПЦР, она показала, что распространение 4,5SH РНК ограничено шестью родственными между собой семействами грызунов. Далее, клонируя и секвенируя кДНК, Гоголевская строго доказала наличие 4,5SH РНК в тканях грызунов, принадлежащих этим семействам. Анализ последовательностей кДНК (рис. 1) выявил, с одной стороны, явную консервативность этой РНК, а с другой стороны – определенный уровень ее гетерогенности внутри каждого организма. Такая гетерогенность скорее всего связана с небольшими различиями между генами 4,5SH РНК внутри одного генома.

Исследования характера организации генов 4,5SH РНК в различных семействах грызунов, а также определение роли прилегающих к ее гену последовательностей до сих пор не проводилось.



				*	20	*	40	*	60	*	80				
Rno1	1	cccccc	atgcctccccc	acgccc	gcgc	atgc	atgc	gcgcgcacag	cagc	gcgcacacag	tcgacgc	cagccctcc	ctacgc	-----	tttt
2	2	cccccc	atgcctccccc	acgccc	gcgc	atgc	atgc	gcgcgcacag	cagc	gcgcacacag	tcgacgc	cagccctcc	ctacgc	-----	tttt
3	3	cccccc	atgcctccccc	acgccc	gcgc	atgc	atgc	gcgcgcacag	cagc	gcgcacacag	tcgacgc	cagccctcc	ctacgc	-----	tttt
4	4	cccccc	atgcctccccc	acgccc	gcgc	atgc	atgc	gcgcgcacag	cagc	gcgcacacag	tcgacgc	cagccctcc	ctacgc	-----	tttt
5	5	cccccc	atgcctccccc	acgccc	gcgc	atgc	atgc	gcgcgcacag	cagc	gcgcacacag	tcgacgc	cagccctcc	ctacgc	-----	tttt
Mau1	1	cccccc	atgcctccccc	acgccc	gcgc	atgc	atgc	gcgcgcacag	cagc	gcgcacacag	tcgacgc	cagccctcc	ctacgc	-----	tttt
2	2	cccccc	atgcctccccc	acgccc	gcgc	atgc	atgc	gcgcgcacag	cagc	gcgcacacag	tcgacgc	cagccctcc	ctacgc	-----	tttt
3	3	cccccc	atgcctccccc	acgccc	gcgc	atgc	atgc	gcgcgcacag	cagc	gcgcacacag	tcgacgc	cagccctcc	ctacgc	-----	tttt
Smi1	1	cccccc	atgcctccccc	acgccc	gcgc	atgc	atgc	gcgcgcacag	cagc	gcgcacacag	tcgacgc	cagccctcc	ctacgc	-----	tttt
2	2	cccccc	atgcctccccc	acgccc	gcgc	atgc	atgc	gcgcgcacag	cagc	gcgcacacag	tcgacgc	cagccctcc	ctacgc	-----	tttt
3	3	cccccc	atgcctccccc	acgccc	gcgc	atgc	atgc	gcgcgcacag	cagc	gcgcacacag	tcgacgc	cagccctcc	ctacgc	-----	tttt
Ama1	1	cccccc	atgcctccccc	acgccc	gcgc	atgc	atgc	gcgcgcacag	cagc	gcgcacacag	tcgacgc	cagccctcc	ctacgc	-----	tttt
2	2	cccccc	atgcctccccc	acgccc	gcgc	atgc	atgc	gcgcgcacag	cagc	gcgcacacag	tcgacgc	cagccctcc	ctacgc	-----	tttt
3	3	cccccc	atgcctccccc	acgccc	gcgc	atgc	atgc	gcgcgcacag	cagc	gcgcacacag	tcgacgc	cagccctcc	ctacgc	-----	tttt

Рис. 1 Нуклеотидная последовательность различных кДНК, соответствующих 4,5SH РНК крысы (*Rattus norvegicus* - Rno), золотистого хомячка (*Mesocricetus auratus* - Mau), малого слепыша (*Spalax microphthalmus* - Smi), большого тушканчика (*Allactaga jaculus* - Ama). Rno кДНК вариант 1 был представлен двумя клонами, Ama кДНК варианты 1 и 2 были представлены соответственно тремя и двумя клонами. Все остальные варианты кДНК были представлены по одному клону. Различия в числе остатков Т на 3'-конце может быть объяснено стохастическим характером терминации РНК-полимеразы III. GenBank AC крыса AY228147-AY228151, золотистый хомячок AY228157-AY228159, слепыш AY228152-228156, большой тушканчик AY228144-AY228146.

Цели и задачи исследования

Цели данной работы: исследовать характер организации последовательностей, содержащих ген 4,5SH РНК, у представителей различных семейств грызунов и определить роль последовательностей, прилегающих к гену данной РНК, в его транскрипции.

В связи с этими целями нами были поставлены следующие задачи:

1. Установить, включен ли ген 4,5SH РНК в геномах представителей различных семейств грызунов в состав более длинных повторяющихся последовательностей ДНК.
2. Показать тандемное расположение таких повторов, определить и проанализировать нуклеотидные последовательности некоторых из них.
3. Провести транскрипцию *in vitro* и установить, насколько последовательности, прилегающие к гену 4,5SH РНК, могут быть важны для ее эффективности.
4. Проверить, используя трансфекцию в клетки HeLa, насколько важны 5'-прилегающие последовательности для транскрипции гена 4,5SH РНК в живой клетке.

Научная новизна и практическая значимость

Было определено, что в геномах представителей различных семейств грызунов (мышинные, хомячьи, слепышовые и тушканчиковые) ген 4,5SH РНК включен в состав

длинных повторяющихся последовательностей (4,5SH-повторов). Длина таких повторов варьирует от 4,0 т.п.н. у большого тушканчика до 5,3 т.п.н. у крысы. Показано, что в геноме большого тушканчика 4,5SH-повторы организованы тандемно. Полностью определены нуклеотидные последовательности 4,5SH-повторов из геномов большого тушканчика и крысы, частично - из генома слепыша. Показано, что нуклеотидные последовательности 4,5SH-повтора у филогенетически отдаленных видов (мышь, слепыш, тушканчик), не содержат протяженных участков гомологии, за исключением собственно гена 4,5SH РНК. У близкородственных видов (мышь и крыса) длинные области гомологии чередуются с протяженными, видоспецифическими вставками и делециями. Для всех исследованных 4,5SH-повторов характерно большое количество простых последовательностей. В экспериментах по транскрипции *in vitro* с помощью экстрактов клеток асцитной карциномы Эрлиха и клеток HeLa установлено, что высокая эффективность транскрипции может сильно изменяться при замене последовательностей 4,5SH-повтора, прилегающих к началу гена. Были выявлены: (а) последовательности ДНК, которые могут поддерживать транскрипцию гена 4,5SH РНК на высоком уровне, (б) последовательности, умеренно благоприятные для транскрипции, (в) последовательность, снижающая транскрипцию гена 4,5SH РНК на 2-3 порядка. Показано, что существует не одна уникальная последовательность, которая, будучи расположена перед геном, способствует его активной транскрипции, но нередко встречаются и другие (причем случайные) последовательности, также позволяющие этому гену эффективно транскрибироваться *in vitro*. Исследования по транскрипции гена 4,5SH РНК в клетках HeLa показали высокую значимость нативных последовательностей 4,5SH-повтора для эффективной транскрипции изучаемого гена.

В данной работе впервые исследована структура необычной генетической системы - длинной тандемно повторяющейся последовательности, включающей ген малой РНК - с точки зрения ее эволюции и особенностей транскрипции. Разработанные подходы могут быть использованы для изучения как эволюции и транскрипции генов других малых РНК, так и различных повторяющихся последовательностей.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на Международной Конференции «Advances in Molecular Cell Biology» (Москва, 17 - 18 июня 2004 г.) и на ежегодных научных конференциях аспирантов ИМБ РАН (2004 г. и 2005 г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 2 печатные работы, из них 2 статьи.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 115 страницах, содержит 18 рисунков и 3 таблицы. Работа включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, выводы, список цитированной литературы, включающий 243 источника, и приложение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Консервативность tandemной организации генов 4,5SH PHK.

Для мыши и крысы был показан особый характер организации генов 4,5SH PHK (Schoeniger and Jelinek, 1986). В их геномах длинная (4,2 и 5,3 т.п.н. соответственно) последовательность, содержащая ген 4,5SH PHK, образует кластер из нескольких сотен tandemно организованных повторов. Чтобы проанализировать, консервативна ли такая организация повторяющейся последовательности для представителей других семейств грызунов, геномную ДНК малого слепыша, большого тушканчика, золотистого хомячка, крысы и домового мыши (взятой в качестве контроля), обработанную рестриктазами *Eco* RI, *Bam* HI, *Hind* III, гибридизовали по Саузерну с радиоактивным зондом, специфичным для гена 4,5SH PHK. Для всех исследуемых видов было показано наличие по крайней мере одной гибридизационной полосы, яркость которой сопоставима с полосой, наблюдаемой в случае мыши (рис 2).

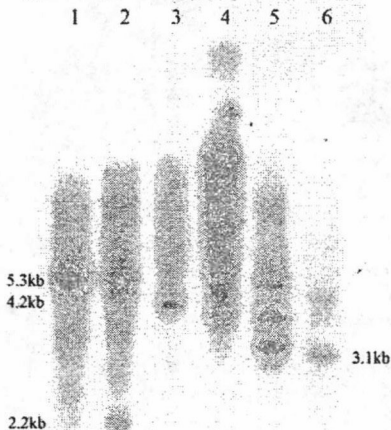


Рис.2. Результаты гибридизации геномной ДНК различных грызунов с мечеными олигонуклеотидами, гомологичными последовательности 4,5S PHK_н мыши, тушканчика и слепыша.

Дор.1 – ДНК крысы, обработанная *Hind* III, фрагмент 5,3 т.п.н.

2 - ДНК крысы, обработанная *Bam* HI, фрагменты 5,3 и 2,2 т.п.н

3 - ДНК мыши, обработанная *Eco* RI, фрагмент 4,2 т.п.н

4 - ДНК хомяка, обработанная *Eco* RI, фрагмент 4,1 т.п.н

5 - ДНК слепыша, обработанная *Bam* HI, нижний фрагмент 3,3 т.п.н

6 - ДНК большого тушканчика, обработанная *Eco*RI, фрагмент 3,1 т.п.н

Это указывает на то, что у анализируемых нами видов ген 4,5SH PHK входит в состав повторяющейся последовательности. Такую последовательность мы назвали 4,5SH-повтором.

Чтобы проверить, сохраняется ли тандемная организации 4,5SH-повтора в эволюции, мы провели исследование этой последовательности у большого тушканчика, представителя семейства Dipodidae, наиболее отдаленного от Muridae среди семейств, обладающих геном 4,5SH PHK. Геномную ДНК тушканчика, переваренную в различной степени рестриктазой *Bgl* II, гибридизовали со специфическим зондом (рис. 3).

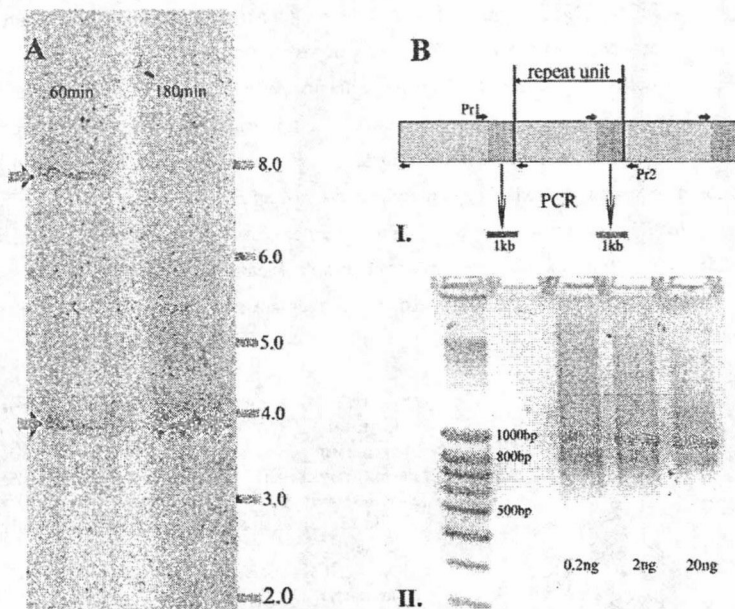


Рис. 3. Тандемная организация 4,5SH-повтора из генома большого тушканчика.
А. Блот-гибридизация по Саузерну частично переваренной рестриктазой *Bgl* II геномной ДНК тушканчика. Время реакции составляло 60 минут для частичного переваривания и 180 минут – для полного. 4.0 т.п.н. и 8.0 т.п.н. фрагменты (указаны стрелками) соответствуют мономеру и димеру 4,5SH-повтора. **Б.** ПЦР-анализ 4,5SH-повтора из генома большого тушканчика. **І** – схема ПЦР. Праймеры (обозначены маленькими стрелками) направлены к концам 3.1 т.п.н. *Eco* RI-фрагмента (светло-серый бокс). 1 т.п.н. *Eco* RI-фрагмент обозначен темно-серым. Показаны три тандемные единицы. **ІІ.** Электрофорез продуктов ПЦР в агарозном геле. Количество геномной ДНК большого тушканчика, использованной в реакции, обозначено внизу.

При полном переваре наблюдалась полоса 4 т.п.н., а при ограниченном переваре появлялась также полоса 8 т.п.н. Эти полосы мы интерпретировали как мономер и димер tandemно повторяющейся единицы.

Полученные данные согласуются с гипотезой о tandemной организации изучаемой последовательности в ДНК тушканчика. Но, поскольку повторяющаяся единица достаточно велика, трудно получить “лесенку” из большого числа олигомеров. Поэтому мы сочли необходимым подтвердить полученные данные с помощью другого эксперимента. В ходе дальнейшей работы был клонирован и секвенирован фрагмент 4,5SH-повтора тушканчика размером 3,1 т.п.н., ограниченный сайтами рестриктазы *Eco* RI. Это дало возможность провести ПЦР с использованием праймеров, комплементарных концам известной последовательности и направленных наружу (рис. 3). При такой направленности праймеров продукт может быть получен, только если повторы расположены tandemно. Как и ожидалось, в ходе ПЦР с различным количеством ДНК-матрицы были получены фрагменты ДНК размером около 1 т.п.н. (рис. 3), что полностью подтверждает tandemное расположение последовательностей, содержащих ген 4,5SH PHK.

Таким образом, можно утверждать, что tandemная организация последовательности, содержащей ген 4,5SH PHK, характерна не только для мыши и крысы (Schoeniger, Jelinek, 1986), но и для филогенетически отдаленного от них большого тушканчика. Поэтому высока вероятность того, что в геномах представителей других семейств, более близких к мышинным, нежели тушканчиковые, эта последовательность также организована как tandemный повтор.

Анализ нуклеотидных последовательностей 4,5SH-повтора.

Нуклеотидная последовательность 4,5SH-повтора была нами определена полностью (большой тушканчик и крыса) или частично (малый слепыш).

Нуклеотидная последовательность собственно гена 4,5SH PHK тушканчика очень сходна с таковой у мыши, в то время как вся остальная часть 4,5SH-повтора большого тушканчика практически не обладала сходством с 4,5SH-повтором мыши. Однако по крайней мере перед геном можно наблюдать небольшие участки гомологии с последовательностями мыши (рис. 4). Как и у мыши, повторяющаяся единица тушканчика богата простыми последовательностями (рис. 5).

Eco RI фрагмент 4,5SH-повтора слепыша размером 2.0 т.п.н. был клонирован и один из клонов был частично секвенирован. Нуклеотидная последовательность гена 4,5SH PHK, содержащегося в этом клоне, несколько отличалась от установленных нами последовательностей кДНК слепыша (однонуклеотидные замены на протяжении всей

последовательности и 10нуклеотидная вставка в 3'-области гена (рис. 4). Однако внутренний промотор и терминатор РНК-полимеразы III остались неизменными. Возможно, этот ген является представителем особого подсемейства генов 4,5SH РНК. Последовательности, фланкирующие ген, обнаруживают короткие участки гомологии с последовательностями мыши (рис. 4). Видимо, у слепыша повторяющаяся единица также богата простыми последовательностями, поскольку на секвенированном участке длиной 960 пн представлены две простые последовательности - (TG)₁₆ и (GA)₁₇.



Рис. 4. Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена 4,5SH РНК и его фланкирующих последовательностей длиной 100 н.п. Точка старта транскрипции обозначена «1». Обозначены боксы А и В и терминатор РНК-полимеразы III (Т₇). Номера доступа GenBank X60026, AY228160, AY828231 и AY828230 для мыши, крысы, слепыша и большого тушканчика соответственно.

Schoeniger & Jelinek (1986) оценили величину повторяющейся единицы, включающей ген 4,5SH РНК, в геноме крысы в 5,3 т.п.н., но не определили ее нуклеотидную последовательность. Нами было обнаружено, что рестриктаза *Bam* HI вырезает фрагмент 2,2 т.п.н., содержащий ген 4,5SH РНК. Было получено несколько клонов, содержащих этот фрагмент, и один из них был секвенирован (номер доступа в GenBank AY228160). Гомология прилегающих к гену 4,5SH РНК крысы последовательностей с последовательностями мыши, как и ожидалось, была заметно выше, чем у тушканчика и слепыша (рис. 4). Поиск в Rat Genome DataBase базе данных генома крысы участков, сходных с этим 2,2 т.п.н. фрагментом ДНК выявил неаннотированный длинный фрагмент генома крысы (номер доступа в GenBank AC109432.2), содержащий три полноразмерные

повторяющиеся единицы, включающие ген 4,5SH PHK. Таким образом, мы получили возможность сравнить полноразмерные 4,5SH-повторы не только у отдаленных видов (мышь и большой тушканчик), но и у близкородственных (мышь и крыса).

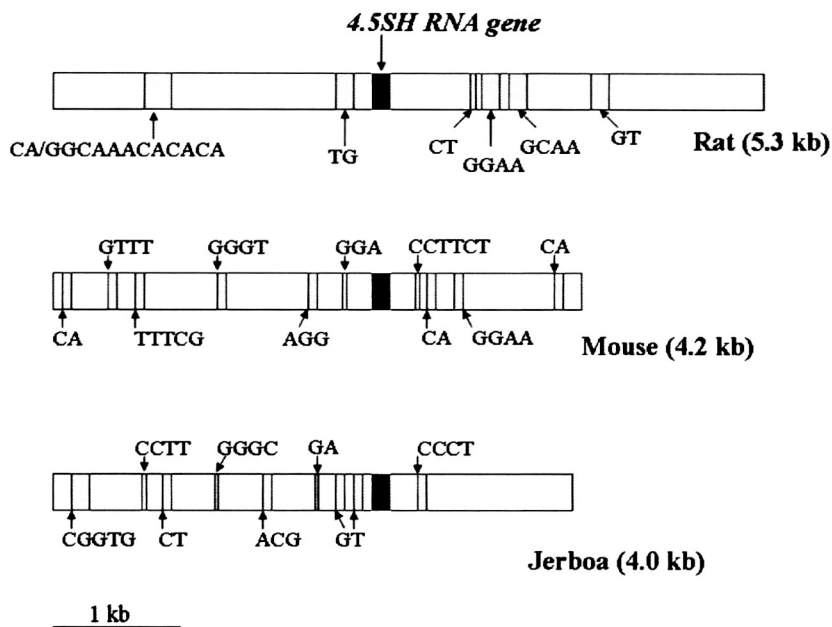


Рис. 5. Расположение простых последовательностей в 4,5SH-повторе крысы, мыши и большого тушканчика. Ген 4,5SH PHK обозначен черным цветом, простые последовательности – серым. Указаны нуклеотидные последовательности повторяющихся единиц.

При выравнивании нуклеотидных последовательностей повторяющихся единиц, включающих ген 4,5SH PHK, мыши и крысы мы обнаружили, что участки гомологии прерываются последовательностями, имеющимися только у одного из этих видов. Видимо, видоспецифические последовательности появились в результате делеций и вставок, произошедших после дивергенции этих двух видов грызунов. Сами последовательности гена практически идентичны у крысы и мыши. Уровень сходства между другими гомологичными последовательностями 4,5SH-повтора крысы и мыши составляет около 80%, что характерно для нейтрально эволюционирующих последовательностей этих двух видов (O'Huigin and Li, 1992). В 4,5SH-повторе крысы, как и у мыши, тушканчика и слепыша, часто встречаются простые последовательности. Некоторые из них сходны по локализации и образующим их мотивам с простыми

последовательностями 4,5SH-повтора мыши, хотя и могут иметь иную протяженность (рис. 5). Видимо, в эволюции повторяющейся последовательности, содержащей ген 4,5SH РНК, большую роль играют не только замены нуклеотидов, но и особенно протяженные вставки и делеции, а также амплификация простых последовательностей.

Транскрипция гена 4,5SH РНК мыши в системе *in vitro*

Значение 5'-фланкирующих последовательностей 4,5SH-повтора для транскрипции гена 4,5SH РНК.

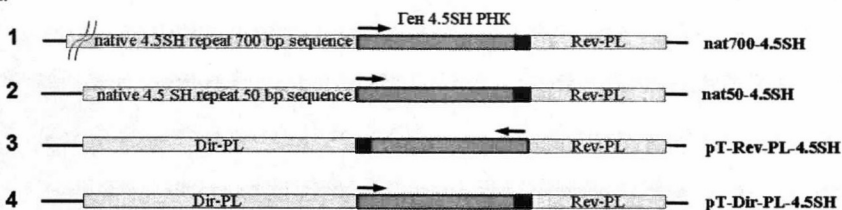
Первоначально нашей целью было выяснить, значимы ли 5'-фланкирующие последовательности гена 4,5SH РНК для его транскрипции, или для обеспечения ее необходимого уровня достаточно наличия внутреннего промотора. Для этого на основе последовательностей 4,5SH-повтора мыши нами были созданы конструкции, включающие ген 4,5SH РНК мыши с расположенными перед ним участками длиной 700 п.н. (конструкция pat700-4.5SH) или 50 п.н. (конструкция pat50-4.5SH), и ген 4,5SH РНК мыши без прилегающих последовательностей 4,5SH-повтора (рис. 6). Соответствующие фрагменты ДНК получали с помощью ПЦР и клонировали в плазмиде pGEM-T, специально предназначенной для работы с амплифицированными фрагментами. Ген 4,5SH РНК мыши, лишенный фланкирующих последовательностей, был вставлен в вектор в двух возможных ориентациях:

- В первой из них непосредственно перед геном расположен участок полилинкера (PL - polylinker), прилегающий к фрагменту плазмиды, гомологичному последовательности стандартного праймера M13Dir. Эта 5'-фланкирующая последовательность была обозначена «Dir-PL». Плазмида, в которой ген находится в такой ориентации, получила название pT-Dir-PL-4.5SH.
- Во второй из них непосредственно перед геном расположен участок полилинкера (PL), прилегающий к фрагменту плазмиды, гомологичному последовательности стандартного праймера M13Rev. Такая 5'-фланкирующая последовательность была обозначена «Rev-PL». Плазмиду, в которой ген находится в такой ориентации, стали называть pT-Rev-PL-4.5SH.

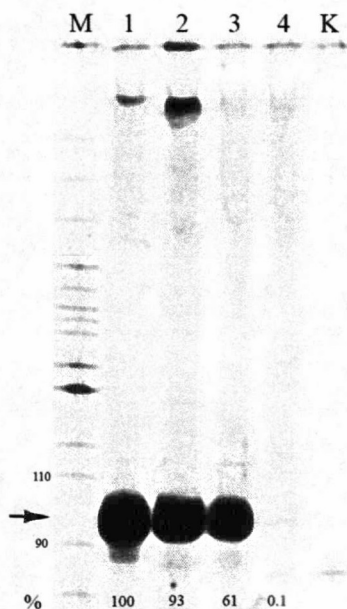
В результате транскрипции *in vitro* с использованием экстракта клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) мы получили следующие результаты (рис 6). При сохранении «родной» 5'-фланкирующей последовательности гена 4,5SH РНК мыши транскрипция была высокоэффективной. Следует отметить, что разница в эффективности транскрипции для конструкций с длинной (700 нп) и укороченной (50 нп) 5'-прилегающей нативной последовательностью составляет всего 7%.

При замене «родной» 5'-фланкирующей последовательности гена 4,5SH PHK мыши на последовательность полилинкера рТ-Rev-PL плазмиды рGEM-T транскрипция остается достаточно эффективной, хотя и уменьшается на 40%.

А.



Б.



В.

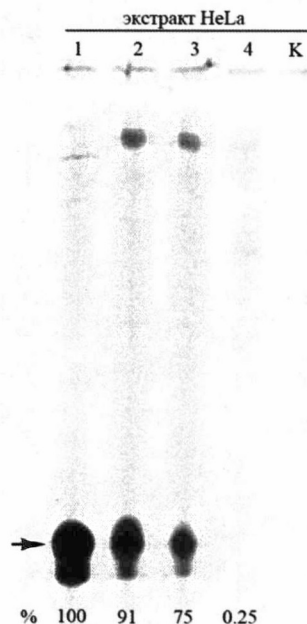


Рис. 6. Транскрипция *in vitro* гена 4.5SH PHK мыши в составе конструкций с различными 5'-прилегающими последовательностями (нативная последовательность 4.5SH –повтора мыши длиной 700 н.п. и 50н.п.; последовательности полилинкера плазмиды рGEM-T, обозначенные Dir-PL и Rev-PL). А. Схема конструкций. Б. Радиоавтограф транскриптов, полученных, разделенных в ПААГ. Реакцию проводили с помощью экстракта клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ). В. Сравнение транскриптов, полученных с помощью экстракта клеток HeLa. Продукты реакции разделяли в ПААГ. Номера дорожек соответствуют номерам конструкций на схеме. Стрелкой обозначена 4.5SH PHK. Цифры под дорожками – интенсивность радиационного сигнала, измеренная фосфоимеджером, выраженная в процентах (за 100% взят сигнал конструкции nat700-4.5SH, полученный в экстракте АКЭ (Б) и в экстракте HeLa (В)).

При использовании же в качестве матрицы для синтеза РНК конструкции рТ-DiR-PL-4,5SH эффективность транскрипции резко снижается и становится близка к нулю (0,1% от уровня первоначальной транскрипции).

Поскольку для транскрипции *in vitro* большинство авторов использует экстракт человеческих клеток HeLa, мы проверили, какая картина транскрипции вышеописанных плазмид будет наблюдаться с экстрактом этих клеток. Хотя в целом транскрипция оказалась менее интенсивной, полученный результат очень напоминал транскрипцию с использованием экстракта клеток АКЭ: нативная последовательность 4,5SH-повтора мыши обеспечивает высокоэффективную транскрипцию гена 4,5SH РНК, последовательность Rev-PL плазмиды рGEM-T несколько снижала уровень транскрипции (75,3% от первоначального уровня), тогда как последовательность DiR-PL плазмиды рGEM-T резко уменьшала эффективность транскрипции до 0.25% от уровня нативной 5'-прилегающей последовательности (рис. 6).

Долгое время считалось, что для генов, транскрибируемых РНК-полимеразой III, наличие внутреннего промотора, состоящего из боксов А и В, полностью определяет эффективность транскрипции (Geiduschek, Toccini-Valentini, 1988). Позднее появились данные о влиянии 5'-фланкирующих последовательностей на транскрипцию двух копий SINE Alu (Chesnokov and Schmid, 1996; Shaikh et al, 1997). Однако это влияние носило характер модуляции, и эффективность транскрипции изменялась в 2 – 10 раз, что могло быть связано в основном с отсутствием собственных 5'-фланкирующих последовательностей.

В нашей работе с геном 4,5SH РНК эффект, оказываемый 5'-прилегающей последовательностью DiR-PL на транскрипцию, изменяет ее уровень на 2-3 порядка. Столь сильное и явное влияние определенной случайной 5'-прилегающей последовательности на транскрипцию гена с помощью РНК-полимеразы III привлекло наше внимание, и мы решили исследовать его подробнее.

Влияние последовательности DiR-PL на транскрипцию других генов.

Чтобы проверить, влияют ли последовательности полилинкера плазмиды рGEM-T только на транскрипцию гена 4,5SH РНК мыши, или они способны также влиять на другие гены, транскрибируемые РНК-полимеразой III, мы создали конструкции на основе B2 SINE (Short Interspersed Element) мыши. Конструкции включали первые 65 п.н. одной из копий B2 генома мыши, содержащие боксы А и В промотора РНК-полимеразы III, а также искусственно введенный терминатор этой РНК-полимеразы, состоящий из семи остатков тимидина. Такой «укороченный» B2-элемент мы обозначили B2pT (или miniB2)

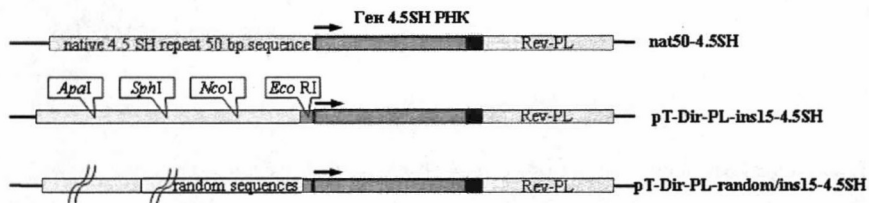
и включили в состав pGEM-T в двух разных ориентациях – Dir и Rev. При транскрипции данных конструкций *in vitro* с использованием экстракта клеток АКЭ мы получили ожидаемый продукт длиной около 70 н. Для конструкции B2pT с 5'-прилегающей последовательностью Rev-PL был характерен высокий уровень транскрипции, а для конструкции Dir-PL-B2pT эффективность транскрипции резко снижалась до 7% от уровня транскрипции для конструкции Rev-PL-B2pT. Тем самым было показано, что не только в случае гена 4,5SH PHK последовательность Dir-PL способна ингибировать транскрипцию *in vitro*, осуществляемую PHK-полимеразой III, а последовательность Rev-PL – эффективно поддерживать такую транскрипцию.

Воздействие различных 5'-прилегающих последовательностей на транскрипцию гена 4,5SH PHK.

Мы предположили, что ингибирующее воздействие последовательности Dir-PL может быть снижено, если данная последовательность не будет непосредственно прилегать к началу гена 4,5SH PHK. Была создана конструкция (pT-Dir-PL-ins15-4.5SH), в которой между последовательностью Dir-PL и геном 4,5SH PHK расположена синтетическая случайным образом выбранная 15-нуклеотидная последовательность, включавшая сайт рестрикции *Eco* RI (рис. 7А). Уровень *in vitro* транскрипции данной конструкции оказался несколько выше, чем для конструкции с последовательностью Dir-PL, непосредственно прилегающей к гену 4,5SH PHK, однако он все же остается низким и составляет 5-8% от уровня транскрипции конструкции с нативной 50-тинуклеотидной 5'-фланкирующей последовательностью (рис. 7Б).

Далее возник вопрос: насколько сильно воздействуют на эффективность транскрипции более длинные случайно выбранные нуклеотидные последовательности, будучи интегрированными непосредственно перед геном 4,5SH PHK. На основе плазмиды pT-Dir-PL-ins15-4.5SH мы создали семь конструкций, в которых перед геном 4,5SH PHK в сайт *Eco* RI были вставлены различные случайные последовательности из генома мыши длиной от 100 до 300 п.н. (рис 7А) При транскрипции этих конструкций *in vitro* можно было наблюдать, что для различных 5'-прилегающих последовательностей уровень транскрипции изменяется, не превышая 22.4%, но не падая ниже 4,5% от уровня транскрипции конструкции pat50-4.5SH (рис. 7). То есть в основном случайно выбранные последовательности хоть и не обеспечивают высокой эффективности транскрипции гена 4,5SH PHK, однако не снижают ее уровень почти до нуля, как конструкция pT-Dir-PL-4.5SH. Значит, последовательность Dir-PL действительно является ингибирующей для транскрипции PHK-полимеразы III.

А.



Б.

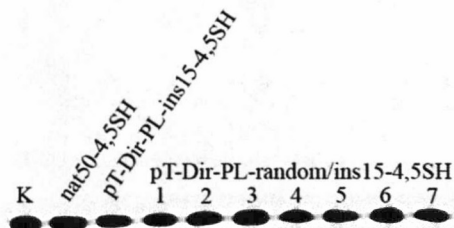
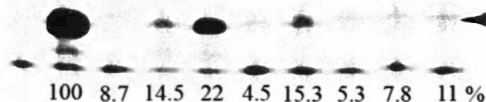


Рис. 7. Транскрипция in vitro гена 4.5SH РНК мыши в составе конструкций с набором случайных 5'-прилегающих последовательностей из генома мыши. А. Схема конструкций. Розовым цветом обозначена последовательность Dir-PL. Б. Радиоавтограф транскриптов, разделенных в ПААГ. Стрелкой обозначена 4.5SH РНК. Цифры под дорожками — интенсивность радиационного сигнала, измеренная фосфоимеджером, выраженная в процентах (за 100% взят сигнал конструкции nat50-4.5SH).



Таким образом, по воздействию на эффективность транскрипции гена 4,5SH РНК можно выделить следующие варианты нуклеотидных последовательностей: (а) последовательности, благоприятные для транскрипции (например, последовательности 4,5SH повтора мыши или полилинкера Rev-PL плазмиды pGEM-T); (б) последовательности почти полностью репрессирующие транскрипцию (полилинкер Dir-PL плазмиды pGEM-T); (с) последовательности, относительно благоприятные для транскрипции (все тестируемые нами случайные последовательности).

Изменение последовательности Dir-PL и воздействие на эффективность транскрипции.

Для более подробного исследования эффекта ингибирования транскрипции на основе конструкции pT-Dir-PL-ins15-4.5SH была создана линия конструкций с делециями фрагментов последовательности Dir-PL. Вырезание проводили рестриктазой *Eco* RI и одной из тех рестриктаз, чьи сайты представлены в полилинкере плазмиды pGEM-T (*Nco*I, *Sph*I, *Apa*I). Так были получены три конструкции, где были удалены соответственно 15 нуклеотидов полилинкера (pT-Dir-PL-*Nco*I-*Eco*RI-4.5SH); 30 нуклеотидов полилинкера (pT-Dir-PL-*Sph*I-*Eco*RI-4.5SH); 42 нуклеотида полилинкера (pT-Dir-PL-*Apa*I-*Eco*RI-4.5SH) (рис. 8).

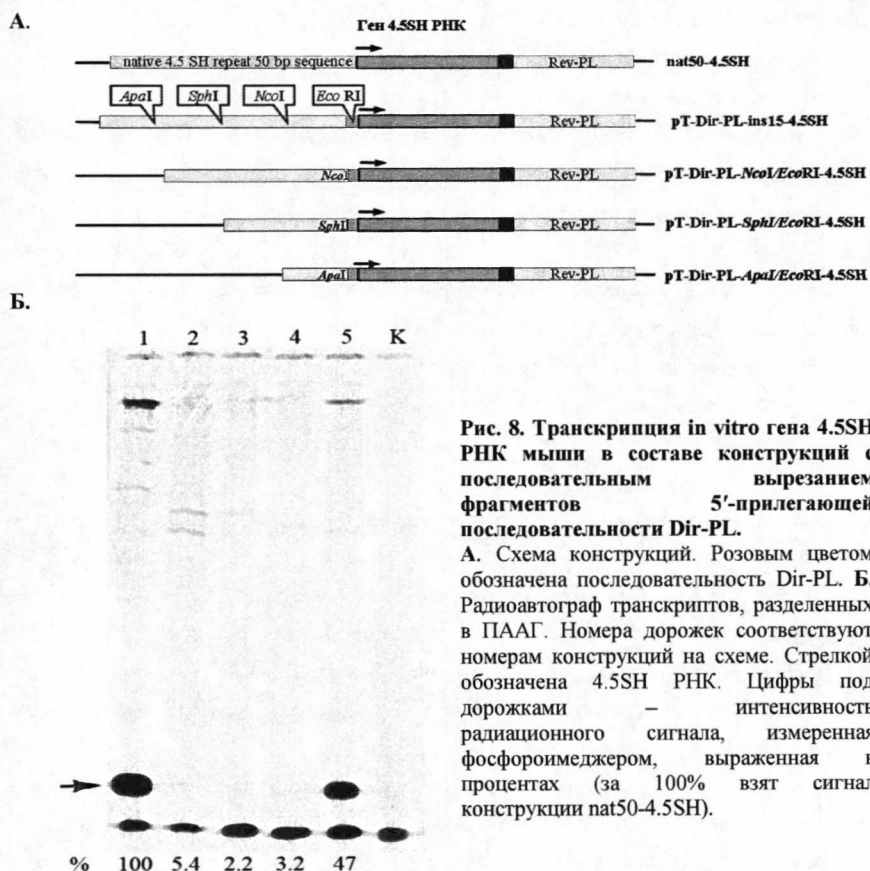


Рис. 8. Транскрипция in vitro гена 4.5SH РНК мыши в составе конструкций с последовательным вырезанием фрагментов 5'-прилегающей последовательности Dir-PL.

А. Схема конструкций. Розовым цветом обозначена последовательность Dir-PL. **Б.** Радиоавтограф транскриптов, разделенных в ПААГ. Номера дорожек соответствуют номерам конструкций на схеме. Стрелкой обозначена 4.5SH РНК. Цифры под дорожками — интенсивность радиационного сигнала, измеренная фосфоимеджером, выраженная в процентах (за 100% взят сигнал конструкции nat50-4.5SH).

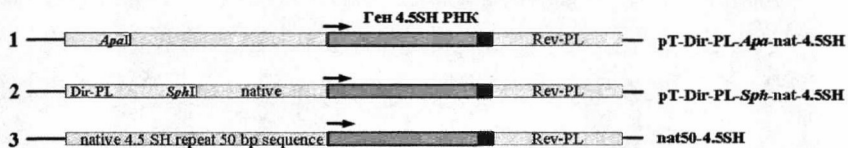
В опытах по транскрипции *in vitro* было обнаружено, что удаление первых 30 нуклеотидов практически не меняет эффективность транскрипции. Удаление следующих 12 нуклеотидов ведет к резкому увеличению транскрипции: уровень транскрипции конструкции pT-Dir-PL-*ApaI-EcoRI*-4.5SH составлял 47% от уровня транскрипции конструкций с нативной последовательностью 4,5-SH повтора мыши (рис. 8).

Далее были созданы конструкции с замещением фрагментов полилинкера Dir-PL на фрагменты последовательности 4,5SH повтора мыши. В полученных конструкциях 5'-фланкирующие участки 4,5SH-повтора соответствовали длине последовательности Dir-PL от начала гена 4,5SH РНК до сайтов рестрикции *SphI* (26 нп) и *ApaI* (38 нп). Конструкции получили названия соответственно pT-Dir-PL-*Sph*-nat-4.5SH и pT-Dir-PL-*Apa*-nat-4.5SH (рис. 9).

В ходе транскрипции *in vitro* этих конструкций при удлиннении нативной 5'-фланкирующей последовательности эффективность транскрипции основного продукта нарастает. Однако наблюдается появление дополнительной полосы, соответствующей длине продукта около 120 н. Появление дополнительного продукта обычно связывают с нарушением процессов терминации. Следует учесть, что в данном случае ген обладает сильным (семь остатков тимидина) терминатором РНК полимеразы III, окружение которого оставалось неизменным во всех проведенных исследованиях, в то время как 5'-фланкирующая последовательность подверглась изменению. Поэтому кажется более вероятным нарушение процесса инициации транскрипции и возможное появление дополнительной точки старта.

Для проверки гипотезы о появлении дополнительной точки старта транскрипции мы использовали удаление РНК из РНК-ДНК дуплексов с помощью РНКазы H. К продуктам транскрипции *in vitro* конструкций nat50-4.5SH, pT-Dir-PL-*Sph*-nat-4.5SH и pT-Dir-PL-*Apa*-nat-4.5SH были добавлены: (1) дезоксиолигонуклеотид, комплементарный 20 нуклеотидам 4,5SH повтора мыши, непосредственно прилегающим к началу гена 4,5SH РНК; (2) дезоксиолигонуклеотид, комплементарный последовательности гена 4,5SH РНК (в позиции от +21 до +39). Затем образцы подвергали обработке РНКазой H. В результате такого эксперимента в первом случае исчезала дополнительная полоса (РНК длиной 120 н.), характерная для транскрипции *in vitro* конструкций pT-Dir-PL-*Sph*-nat-4.5SH и pT-Dir-PL-*Apa*-nat-4.5SH. Во втором случае (контроль) оба транскрипта оказывались разрезанными: появлялся фрагмент РНК длиной 50 нуклеотидов. Таким образом, было показано, что образование дополнительного продукта длиной около 120 нуклеотидов связано с инициацией транскрипции в дополнительной точке, расположенной примерно в позиции -30.

A.



Б.

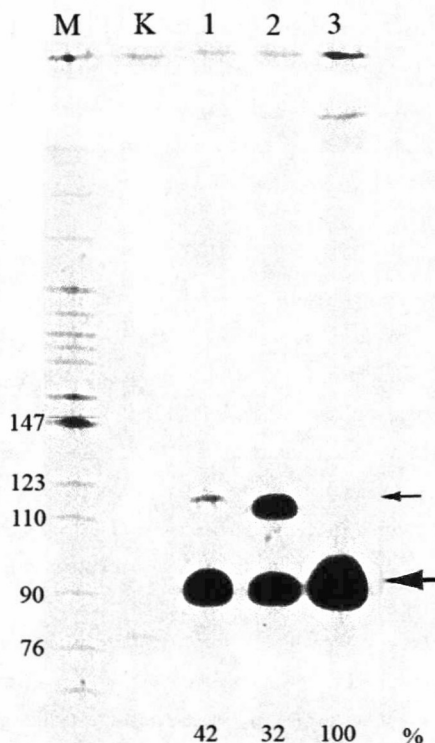


Рис. 9. Транскрипция *in vitro* гена 4.5SH PHK мыши в составе конструкций с заменой 5'-прилегающей последовательности Dir-PL на нативную последовательность 4.5SH-повтора.

А. Схема конструкций. Розовым цветом обозначена последовательность Dir-PL.

Б. Радиоавтограф транскриптов, разделенных в ПААГ. Номера дорожек соответствуют номерам конструкций на схеме. Большой стрелкой обозначен основной продукт транскрипции (4.5SH PHK), тонкой — дополнительная полоса. Цифры под дорожками — интенсивность радиационного сигнала основного продукта, измеренная фосфоимеджером, выраженная в процентах (за 100% взят сигнал конструкции nat50-4.5SH).

Анализируя результаты проведенных экспериментов, можно утверждать, что при транскрипции *in vitro* гена 4,5SH PHK 5'-прилегающие к гену последовательности играют большую роль, как определяя эффективность транскрипции, так и принимая участие в точном определении точки ее старта.

Транскрипция гена 4,5SH PHK мыши в культуре клеток HeLa.

Целью дальнейшей работы было проанализировать, сохраняются ли в живой клетке особенности транскрипции *in vitro* гена 4,5SH PHK мыши.

Для этого была проведена транзиторная трансфекция клеток HeLa плазмидами, содержащими ген 4,5SH РНК мыши. После этого выделенную клеточную РНК анализировали Нозерн-гибридизацией с зондом, специфичным к 4,5SH РНК. (Надо отметить, что мы столкнулись с трудностью в детекции 4,5SH РНК с помощью Нозерн-гибридизации, что, по-видимому, было связано с малым временем жизни этой РНК. Мы обнаружили, что если заменить лежащую непосредственно перед терминатором гена 4,5SH РНК последовательность CTACACA на CAATAAA, то образующаяся РНК легко детектируется, вероятно, благодаря ее большей стабильности в клетке.) Три конструкции с измененным 3'-концом были использованы в этом опыте. Оказалось, что 4,5SH РНК обнаруживалась только в случае конструкции с нативной 5'-фланкирующей последовательностью 4,5SH-повтора мыши, тогда как при трансфекции плазмидами с 5'-прилегающими последовательностями как Dir-PL, так и Rev-PL 4,5SH РНК не детектировалась.

Следовательно, в отличие от *in vitro*-системы, *in vivo* последовательность «Rev-PL» не обеспечивает эффективной транскрипции 4,5SH РНК. Значит, требования к структуре 5'-прилегающей последовательности для транскрипции гена 4,5SH РНК в живой клетке «строже», чем *in vitro*, что свидетельствует о важности фланкирующих последовательностей в регуляции транскрипции данной малой РНК.

Чтобы проверить, характерна ли такая же картина для других последовательностей, транскрибируемых РНК-полимеразой III, мы провели трансфекцию с конструкциями на основе укороченного B2 SINE мыши (B2pT-Dir-PL и B2pT-Rev-PL). После выделения РНК и Нозерн-гибридизации продукт ожидаемой длины (70 н.) был детектирован как для конструкции B2pT с 5'-прилежащей последовательностью Rev-PL, так и для конструкции B2pT с 5'-прилежащей последовательностью Dir-PL. Такой результат отличается от транскрипции *in vitro*, где продукт образовывался только при использовании конструкции B2pT-Rev-PL. Тем не менее, та же тенденция сохранялась: эффективность транскрипции гена с прилегающей последовательностью Dir-PL была ниже в 5 раз, чем у гена с 5'-фланкирующей последовательностью Rev-PL.

Таким образом, влияние последовательностей Rev-PL и Dir-PL различно *in vitro* и в живой клетке для гена 4,5SH РНК и для конструкции на основе B2 SINE мыши. Последовательность Rev-PL, поддерживая высокий уровень транскрипции гена 4,5SH РНК *in vitro*, *in vivo* не оказывает сильного положительного эффекта. В случае конструкции B2pT-Rev-PL высокая эффективность транскрипции наблюдается не только *in vitro*, но и *in vivo*. Способность полностью ингибировать транскрипцию, проявляемая

последовательностью Dig-PL, сохраняется в живой клетке для гена 4,5SH PHK, тогда как для B2 SINE она сильно снижается.

Мнообразие эффектов, оказываемых 5'-прилегающими последовательностями на транскрипцию двух разных малых PHK, позволяет сделать следующие выводы: (1) 5'-фланкирующая последовательность Dig-PL является крайне неблагоприятной для транскрипции гена 4,5SH PHK; (2) воздействие 5'-прилегающей последовательности Rev-PL на транскрипцию гена 4,5SH PHK различается в системе *in vitro* и в живой клетке; то есть требования к последовательностям, обеспечивающим эффективную транскрипцию гена 4,5SH PHK в живой клетке, по-видимому, значительно выше, чем в системе *in vitro*; (3) нативная 5'-фланкирующая последовательность 4,5SH-повтора обеспечивает высокоэффективную транскрипцию гена 4,5SH PHK *in vitro* и в живой клетке. Очевидно, эта нуклеотидная последовательность была оптимизирована в ходе эволюции.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Организация и эволюция генов 4,5SH PHK.

Ген 4,5SH PHK в геномах слепыша, хомяка и тушканчика входит в состав повторяющейся последовательности. В геноме тушканчика, как и в геномах мыши и крысы, эти повторы организованы тандемно. Так как семейство тушканчиковые среди семейств-носителей гена 4,5SH PHK наиболее филогенетически отдалены от мышиных, то представляется очень вероятным, что у представителей других семейств, для которых характерна 4,5SH PHK, этот принцип организации сохраняется.

Почему важен именно тандемный характер организации последовательности, включающей ген, точно не ясно. Такая организация генов характерна также для другой малой PHK - 5S рPHK. Предполагают, что тандемная организация нужна для наработки большого количества 5S рPHK, для обеспечения координированной регуляции экспрессии большого числа генов и для поддержания гомогенности их структуры. Все это может относиться и к генам 4,5SH PHK.

Хотя длина 4,5SH-повтора точно установлена только для трех видов грызунов, уже можно отметить, что эта величина довольно консервативна, и даже у таких дальних родственников, как мышь и тушканчик, она очень близка (4.2 тпн). Длина 4,5SH-повтора крысы отличается всего на 20% (5.3 тпн). Возможно, что поскольку длина 4,5SH-повтора консервативна в эволюции, то она важна для его функционирования.

Нуклеотидные последовательности 4,5SH-повтора у филогенетически отдаленных видов (мышь, слепыш, тушканчик), не содержат протяженных участков гомологии, за исключением собственно гена. У близкородственных видов (мышь и крыса) длинные области гомологии чередуются с протяженными, видоспецифическими вставками и

делециями. Уровень сходства внутри областей гомологии составляет около 80%, что характерно для последовательностей мыши и крысы, не подвергающихся или слабо подвергающихся давлению отбора (O'HUigin and Li, 1992). Доля видоспецифических последовательностей составляет 20% в 4,5SH-повторе мыши и 40% у крысы. Последняя величина оказалась близка к доле (34%) крысо-специфических последовательностей, обнаруженных при сравнении эухроматических частей геномов мыши и крысы. В геноме крысы видоспецифические последовательности в большинстве своем представляют мобильные элементы (25%), тогда как вклад простых и уникальных последовательностей весьма невелик. С другой стороны, в 4,5SH-повторе около половины видоспецифических последовательностей приходится на простые последовательности, а другую часть составляют в основном уникальные последовательности, не являющиеся мобильными элементами. В 4,5SH-повторе мы обнаружили только частичные последовательности трех мобильных элементов: L1 у мыши, RLTR32 у крысы и RMER12 в последовательностях обоих видов. Таким образом, вставки и делеции последовательностей, не относящихся к мобильным элементам, а также амплификация простых последовательностей дают значительно больший вклад в эволюцию 4,5SH-повтора, чем в эволюцию эухроматиновой части генома в целом.

Простые последовательности играют большую роль и для спейсерных областей 5S рДНК, которые большей частью составлены из GC-богатых регулярных и нерегулярных простых последовательностей. Внутри 4,5SH-повтора их значительно меньше, однако и тут их количество сильно превышает среднее значение по геному (рис 5). Ряд таких последовательностей у мыши и крысы, видимо, являются гомологами, но другие, скорее всего, образовались *de novo* после дивергенции этих видов.

Роль простых последовательностей в целом в геноме детально не ясна. Для некоторых генов показано участие простых последовательностей в регуляции сплайсинга и транскрипции (Gerhardt et al, 2000; Majewski and Ott, 2002). Образуя неканонические структуры ДНК (шпильки, триплексы, квадруплексы), участвуя в неУотсон-Криковских взаимодействиях, простые последовательности могут играть существенную роль в организации хроматина (Catasti et al, 1999). Возможно, простые последовательности могут быть важны и для функционирования гена 4,5SH PHK, несмотря на кажущееся отсутствие закономерностей в их распределении внутри 4,5SH-повтора. Кроме того, кажется вполне вероятным, что в эволюции амплификация простых последовательностей может играть роль одного из механизмов поддержания размера 4,5SH-повтора.

Суммируя, можно представить следующий сценарий. Эволюция 4,5SH PHK, видимо, началась с перестройки одной из копий B1 SINE, относящейся к варианту

pB1d10. Транскрипт возникшего гена мог быть рекрутирован клеткой. Функция, выполняемая этой РНК, могла потребовать высокого уровня ее синтеза, что и повлекло за собой дальнейшие изменения нуклеотидной последовательности гена и его амплификацию. Такая амплификация могла происходить вместе с окружающими ген последовательностями, что привело к возникновению тандемного повтора. Дальнейшая дивергенция грызунов привела к независимой эволюции возникшего 4,5SH-повтора внутри каждого вида. При этом параллельно могли осуществляться три процесса: нуклеотидные замены внутри последовательностей, появление крупных делеций и вставок и изменение длин простых последовательностей. Это привело к окончательной потере гомологии в 4,5SH-повторах представителей разных семейств грызунов при сохранении структуры самого гена. Высокое сходство копий 4,5SH-повтора внутри одного вида, как и у других тандемных повторов, поддерживается механизмами геномной конверсии (Liao 1999). Однако поскольку эти механизмы не обладают абсолютной эффективностью, возникает гетерогенность всего 4,5SH-повтора, включая сами гены 4,5SH РНК.

Транскрипция генов 4,5SH РНК.

Некоторое время считалось, что транскрипция генов класса III с промотором 2 типа, состоящим из боксов А и В, не зависит от последовательностей, окружающих ген. Однако исследования транскрипции различных генов tPHK и 7SL РНК показали сильное влияние их собственных 5'-фланкирующих областей на уровень экспрессии этих генов. С другой стороны, изучение коротких повторяющихся последовательностей (SINE) в геномах человека и грызунов демонстрирует их способность к эффективной транскрипции, зависящей только от внутреннего промотора. 4,5SH РНК ведет свое происхождение от элемента B1, обладающего сильным внутренним промотором, а последовательности, прилегающие к ее гену, у различных грызунов отличаются большим разнообразием. Поэтому вопрос о роли 5'-фланкирующих последовательностей в транскрипции гена 4,5SH РНК представлял особый интерес.

Эксперименты по транскрипции *in vitro* гена 4,5SH РНК мыши показали, что высокая эффективность транскрипции, характерная для конструкций, содержащих 5'-прилегающие к началу гена нативные последовательности 4,5SH-повтора, изменяется при замене «родных» фланкирующих участков. Были выявлены: (а) последовательности, которые могут поддерживать транскрипцию гена 4,5SH РНК на высоком (примерно две трети от первоначального) уровне, (б) последовательности, умеренно благоприятные для транскрипции, (в) последовательность, снижающая транскрипцию гена 4,5SH РНК на 2-3 порядка.

Столь широкий диапазон воздействий определяет, что, во-первых, 5'-прилегающие последовательности важны для транскрипции гена 4,5SH PHK, несмотря на наличие внутреннего промотора. Во-вторых, по-видимому, существует не одна уникальная последовательность, которая, будучи расположена перед геном, способствует его активной транскрипции, но нередко встречаются и другие (причем случайные) последовательности, также позволяющие этому гену эффективно транскрибироваться *in vitro* (надо отметить, что это хорошо согласуется и с высокой изменчивостью структуры 4,5SH-повтора). То есть при транскрипции *in vitro* должны выполняться определенные требования к структуре 5'-прилегающего к гену 4,5SH PHK фрагмента, но они не чрезмерно жесткие.

Ингибирующее воздействие на транскрипцию гена 4,5SH PHK последовательности Dir-PL оказалось исключительно сильным. При начальном анализе подобный эффект (практически полное подавление транскрипции) мог быть объяснен двояко: как следствие ингибирующего воздействия самой последовательности Dir-PL или как следствие отсутствия необходимой активирующей последовательности. Но при размещении перед геном 4,5SH PHK различных случайных последовательностей из генома мыши ни для одной из последовательностей уровень транскрипции данного гена не снижался почти до нуля. Значит, последовательность Dir-PL воздействует на транскрипцию гена 4,5SH PHK мыши, угнетая ее. Было показано, что репрессирующее воздействие снижается и транскрипция восстанавливается примерно на 50% только при удалении большого (40 нуклеотидов) фрагмента последовательности Dir-PL, прилегающего к началу гена 4,5SH PHK. Частичное удаление последовательности Dir-PL практически не усиливало транскрипцию, то есть данный регион неблагоприятен для транскрипции на всем своем протяжении.

При постепенном замещении последовательности Dir-PL на нативную последовательность 4,5SH-повтора мы столкнулись с образованием в ходе транскрипции *in vitro* дополнительного, более длинного продукта (рис 9) и показали, что его формирование определяется возникновением новой точки старта транскрипции в позиции приблизительно -30 н.п. Современные исследования показывают, что за точное позиционирование РНК-полимеразы III относительно точки старта отвечает транскрипционный фактор TFIIB, который может взаимодействовать с рядом дополнительных белковых факторов, а также с последовательностью TATA, расположенной выше начала некоторых генов (Kassavetis and Geiduschek, 2006). Структура 5'-прилегающего региона конструкции pT-Dir-PL-Sph-nat-4.5SH включает последовательность TATA на расстоянии 52 нуклеотида от начала гена 4,5SH PHK, а

также последовательность, схожую с боксом А гена 4,5SH РНК в позиции от -19 до – 9 нп. На расстоянии примерно 24 нуклеотида от точки старта транскрипции гена 4,5SH РНК расположена последовательность GGGCG, схожая с началом данного гена. Возможно, взаимное расположение этих регионов и формирует новую дополнительную точку старта транскрипции.

При проведении экспериментов по транскрипции гена 4,5SH РНК с различными 5'-прилегающими последовательностями в культуре клеток HeLa мы обнаружили отличия в поведении гена *in vitro* и *in vivo*. В живой клетке способными к эффективной транскрипции оказываются только конструкции, содержащие 5'-фланкирующую ген нативную последовательность 4,5SH-повтора. Это указывает на то, что *in vivo* требования к последовательностям, лежащим перед геном 4,5SH РНК значительно выше, что может быть обусловлено более естественным состоянием транскрипционной машины РНК-полимеразы III и особенно ее транскрипционных факторов.

Опыты с miniB2 элементом свидетельствуют о том, что при транскрипции разных генов класса III с промотором 2 типа требования к 5'-фланкирующим ген областям различаются. Однако даже если основную роль в регуляции активности генов играют внутренние последовательности А и В боксов, 5'-прилегающие последовательности могут оказывать значительное влияние на эффективность транскрипции. Этот факт ставит перед нами новые интересные задачи.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что ген 4,5SH РНК входит в состав длинной повторяющейся последовательности (4,5SH-повтор) не только в геномах мышей и крыс, но и у представителей других семейств грызунов: хомячьих, слепышовых и тушканчиковых. Показано, что в геноме большого тушканчика также, как у мышей и крыс, эти повторы организованы тандемно. Это свидетельствует о консервативности в эволюции такого принципа организации генов 4,5SH РНК.

2. Секвенированы 4,5SH-повторы тушканчика (*Allactaga major*) и крысы (*Rattus norvegicus*). 4,5SH-повторы, исключая собственно гены 4,5SH РНК, быстро изменяются в эволюции, хотя их длина варьирует лишь незначительно - от 4,0 до 5,3 тыс. пар нуклеотидов. 4,5SH-повторы содержат много простых последовательностей.

3. Изучение транскрипции гена 4,5SH РНК с помощью клеточного экстракта показало, что 5'-фланкирующая последовательность ДНК важна для транскрипции этого гена РНК-полимеразой III. В то же время оказалось, что некоторые случайные чужеродные последовательности ДНК, будучи интегрированными непосредственно перед геном 4,5SH РНК, также способны обеспечивать эффективную транскрипцию. Это свидетельствует о не очень жестких требованиях к первичной структуре 5'-фланкирующей последовательности исследуемого гена в опытах *in vitro*.

4. Показано, что при трансфекции клеток конструкциями, несущими ген 4,5SH РНК, только «родная» 5'-фланкирующая последовательность обеспечивает эффективную транскрипцию данного гена, что указывает на более высокие требования к этому району 4,5SH-повтора при транскрипции гена 4,5SH РНК в живой клетке.

Список печатных работ, опубликованных по теме диссертации:

Статьи

1. I.K. Gogolevskaya, A.P. Koval, and D.A. Kramerov. Evolutionary history of 4.5SH RNA. // Molecular Biology and Evolution. - 2005. - № 22. - Pp. 1546-1554.

2. A. Koval, I. Gogolevskaya, and D. Kramerov. 4.5S RNA_H and its genes: structure, evolution, and transcription // Advances in Molecular Cell Biology. - М.: Макс-Пресс, 2004. - С. 83-91.

Регистрационные номера (GenBank) нуклеотидных последовательностей, установленные автором:

AY228160 *Rattus norvegicus* 4.5S RNA(H) repeat region, partial sequence (2341 п.н.).

AY828231 *Spalax microphthalmus* 4.5S RNA(H) repeat region, partial sequence (621 п.н.).

AY828230 *Allactaga major* 4.5S RNA(H) repeat region, complete sequence (3969 п.н.).

Подписано в печать 12.11.2008 г.

Печать трафаретная

Заказ № 1165

Тираж: 100 экз.

Типография «11-й ФОРМАТ»
ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36
(499) 788-78-56
www.autoreferat.ru

10